

# 学 位 論 文 の 要 旨

## 核酸アプタマーの機能向上及び選択法の改良等に係る要素技術開発

(Development of technologies related to improvement of function of aptamer and improvement of selection method)

氏 名 萩 原 健 太 印  
(Kenta Hagiwara)

核酸アプタマーは、塩基配列に依存して立体構造を形成するため、標的に対して特異的な結合活性を示す。核酸アプタマーの創製法である試験管内選択 (SELEX) 法は、配列が多様な DNA や RNA (ライブラリ) に対して選別と増幅の 2 つの過程を繰り返し、標的分子に特異的に結合するものを取得するという進化分子工学的な方法である。典型的な方法では、固相などに固定化した標的分子 (タンパク質や小分子など) とライブラリとを混合し、標的に結合しない不活性な配列を除いた後、標的に結合する活性配列を回収する操作を行う。しかしながら、この方法は、活性配列に非特異的に結合した配列の混入が避けられず、活性配列を濃縮するのに時間がかかるという問題があった。そこで、選別の過程にキャピラリー電気泳動 (CE) 法を用いた CE-SELEX 法が開発された。CE-SELEX 法は、活性配列が不活性配列よりも先に得られるため、典型的な方法と比べより迅速にアプタマーの取得が可能である。そこで本研究では、核酸アプタマーの実用化のために核酸アプタマーの機能向上を指向した修飾 DNA アプタマーの創製法の開発 (2 章) や CE-SELEX 法の適用範囲の拡大 (3 章)、核酸アプタマー量産のための酵素的合成法 (4 章) について検討した。

第 2 章では、これまで取得が難しかった糖修飾核酸アプタマーの創製を試みた。化学修飾核酸アプタマーは、医薬品や診断薬などに応用することができる。本研究では、糖修飾核酸である 2'-フルオログアノシンを含む DNA ライブラリを構築し、CE-SELEX 法に用いた。その結果、活性種の濃縮は、DNA アプタマーのセレクションにおける濃縮効率に匹敵した。濃縮ライブラリからクローニング法により活性配列を単離・同定することで、糖修飾核酸を含む DNA アプタマーを取得することに成功した。さらに、得られた核酸アプタマーの親和性や構造、生体安定性を分析した。修飾基の有効性の検討は、比較対象として同じ配列で、2'-フルオログアノシンを天然型の 2'-デオキシグアノシンに置換した DNA アプタマーを作製し行った。その結果、得られた糖修飾核酸アプタマーは、標的分子に対して結合活性を示したが、DNA アプタマーは結合活性を示さないことが明らかになった。また、DNA アプタマーの構造と比べると得られた糖修飾核酸アプタマーは、異なる構造であると示された。さらに、糖修飾核酸アプタマーの生体安定性は、DNA アプタマーの 2 倍高

くなることが明らかになった。これらの結果は、本法により生体安定性が向上した糖修飾 DNA アプタマーを効率的に取得できることを示している。

第 3 章では、CE-SELEX 法の適用範囲の拡張を試みた。特に、SELEX 法におけるライブラリの鎖長に注目した。CE-SELEX 法では、これまで 70~80 量体のライブラリが使用されてきた。これは、鎖長が長くなるとキャピラリー電気泳動での分離能が低下するためである。しかし、典型的な方法を含む他の方法は、100 量体を超えるライブラリを使用することがあり、高い親和性の核酸アプタマーの取得が報告されている。そのため、CE-SELEX 法に 100 量体ライブラリを用いることで、より迅速かつ簡便に高親和性の核酸アプタマーを取得できると期待される。本研究では、既知の 100 量体アプタマー (100TBA) を用いてキャピラリー電気泳動の分離条件を精査した。これまでの測定条件では、100TBA の標的/アプタマー複合体ピークと遊離のアプタマーピークがほぼ同じ位置に観測された。しかし、分離条件を最適化したことで、両ピークを分けることに成功した。最適化条件による 100 量体ライブラリ (100TBA を 0.0001% 含む) を用いた CE-SELEX 法を行ったところ、100TBA を濃縮することに成功した。この最適化された分離条件により、長鎖核酸ライブラリを CE-SELEX 法に用いることが可能になった。

第 4 章では、核酸アプタマーの量産のためにポリメラーゼを用いた酵素的合成を検討した。現在、一般に、核酸医薬品に用いられるオリゴヌクレオチドは、有機化学的に合成されており、酵素法による合成は実用化されていない。しかし、ポリメラーゼを用いた酵素法では、鋳型鎖に対して忠実にその相補鎖を合成できるため、核酸アプタマー等の核酸医薬品を酵素法によって製造できる可能性がある。さらに、酵素を固定化すれば、反応系中から酵素を回収できるため、効率的な酵素反応系を構築できるかもしれない。そこで本研究では、固定化ポリメラーゼを調製し、DNA や修飾 DNA のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を試みた。固定化ポリメラーゼによる PCR を検討したところ、遊離のポリメラーゼと同様に合成が可能であった。さらに、固定化ポリメラーゼを PCR 反応液から回収し、酵素を含まない新しい反応液を加え、続いて PCR を行った。その結果、目的物の生成を確認することができた。さらに、少なくとも 2 回は繰り返し利用できることも明らかになった。また、DNA の合成と同様に塩基修飾やリン酸修飾を含む DNA の合成もできることが分かった。

本論文において得られた結果は、今後、高活性な核酸アプタマーの取得や核酸アプタマーの工業的製造に寄与するものと期待される。

(英訳)

Aptamers specifically bind to targets because their three-dimensional structures depend on their sequences. Aptamers can be created through the systematic evolution of ligands in the exponential enrichment (SELEX) method, a directed evolutionary method that repeats the selection and amplification steps against a DNA or RNA library containing various sequences. In conventional methods, the target molecules are immobilized on the solid phase (affinity gel and nitrocellulose), and are mixed with the library in the separation step. Unbound oligonucleotide sequences are removed by washing the binding complexes several times. The target-binding oligonucleotides are then eluted and subsequently amplified by PCR. However, the target-bound oligonucleotides are inevitably contaminated by unbound oligonucleotides, and obtaining the active sequences is time-consuming. To avoid these problems, capillary electrophoresis (CE) was introduced to SELEX. The CE-SELEX technique quickly obtains the aptamers because the target-bound oligonucleotides elute faster than the unbound oligonucleotides.

In this study, I developed methods for creating modified DNA aptamers (Chapter 2), expanding the applicability of CE-SELEX (Chapter 3), and synthesizing enzymes for the mass production of aptamers (Chapter 4).

In Chapter 2, I attempted to modify aptamers from a sugar-modified oligonucleotide library. Chemically modified aptamers are applied in medicine and diagnostics. In this study, a DNA library containing 2'-fluoro guanosine was produced for use in CE-SELEX. Enrichment of the sugar-modified aptamers was efficiently progressed by the CE-SELEX procedure. The sugar-modified DNA aptamers were isolated from the enrichment by a cloning method, and their active sequences were successfully identified. The obtained aptamers were analyzed for their affinity, structure and biostability. The effect of the 2'-fluorine group on the target binding was established using DNA aptamers, which contain only natural nucleotides in the non-primer region. The DNA aptamers exhibited no binding affinity to the target. The sugar-modified aptamers exhibited a different structure to the DNA aptamers, and their biostability was twice that of the DNA aptamers. These results confirm that CE-SELEX yields sugar-modified DNA aptamers with improved biostability.

In Chapter 3, I attempted to expand the applicability of CE-SELEX, focusing on the length of the library in SELEX. Owing to the resolution of the electrophoresis separations, the DNA libraries in CE must usually contain 70- or 80-mer oligonucleotides. Although the peak separation degrades with increasing length of the DNA sequence, long-length DNA libraries may be desired, because high-affinity aptamers with lengths of 100-mer or longer have been obtained by SELEX methods not involving CE. Therefore, a CE-SELEX-using library containing 100-mer oligonucleotides is expected to quickly and easily obtain high-affinity aptamers. In this study, I investigated electrophoresis separation and aptamer enrichment by CE-SELEX using a 100-mer thrombin-binding DNA aptamer (100TBA). I first separated the 100TBA-target complex under the standard conditions of electrophoresis separation. In the presence of the target, a slight peak

broadening appeared before the main peak migration. Under the optimized conditions, the peak separation was significantly improved, and a trace amount of 100TBA (~0.0001%) in the 100-mer DNA library was sufficiently enriched after a few rounds of CE–SELEX. These experiments indicated that under the optimal separation conditions, CE–SELEX can access a long-chain library.

In Chapter 4, I examined the mass production of aptamers by polymerase-based enzymatic synthesis. Currently, nucleic acids for medicine are mainly synthesized by organic procedures not involving enzymes. However, as DNA polymerases can easily synthesize oligonucleotide strands with high efficiency and accuracy using complementary template strands, enzyme techniques are expected to be applied to the production of nucleic acids for therapeutic purposes, such as aptamers. Furthermore, immobilized enzymes can be recovered from the reaction mixture, realizing an efficient enzyme system. In this study, I attempted the efficient syntheses of DNA and modified nucleic acids using DNA polymerase immobilized on a solid-phase support. PCR using immobilized polymerase can synthesize DNA and base-modified (with either a nucleotide or phosphorothioate) DNA. I demonstrated that the immobilized polymerases separate from the PCR products and can be reused several times (at least twice). Furthermore, they synthesized DNA and base-modified DNA as surmised above.

These results are expected to contribute to the future acquisition of high functional aptamers and enable their industrial production.